

Особенности продукции внеклеточных хитиназ и β -маннааз алкалофильным штаммом *Bacillus mannanilyticus* IB-OR17

Э. А. Гайдук¹, Н. Ф. Галимзянова², Е. А. Гильванова²,
Г. Э. Актуганов^{2*}

¹Уфимский государственный нефтяной технический университет
Россия, Республика Башкортостан, 450062 г. Уфа, улица Космонавтов, 1.

²Уфимский институт биологии РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 69.

*Email: gleakt@anrb.ru

Впервые обнаружена способность нового штамма алкалофильного вида *Bacillus mannanilyticus* IB-OR17 к деградации хитина. Изучены некоторые аспекты синтеза хитиназ и β -маннааз исследуемым штаммом при глубинном культивировании. Установлен индуцибельный характер продукции хитиназ *B. mannanilyticus* IB-OR17 при конститутивной продукции β -маннааз. Максимальный уровень продукции хитиназ отмечен в области оптимума роста бактерий при pH 9.0–10.0. Исследовано влияние источников углерода на биосинтез β -маннааз *B. mannanilyticus* IB-OR17.

Ключевые слова: *Bacillus mannanilyticus*, алкалофильные бактерии, хитиназа, β -маннааза.

В последние двадцать лет развития биотехнологий одним из наиболее привлекательных объектов фундаментальных и прикладных исследований остаются алкалофильные микроорганизмы, развивающиеся исключительно при повышенных значениях pH и предпочитающие, как правило, щелочные местообитания, экстремальные для большинства представителей нормофильной микробиоты. Ключевым аспектом прикладных исследований алкалофилов является их значительный биотехнологический потенциал как продуцентов внеклеточных ферментов, экзополисахаридов и биологически активных метаболитов с особыми свойствами, в первую очередь, способных выдерживать экстремально высокие значения pH окружающей среды [1]. С фундаментальной точки зрения, алкалофильные бактерии представляют интерес для изучения особенностей их физиологии, выявления биохимических и молекулярных механизмов их устойчивости к щелочным условиям, а также для оценки экологической роли алкалофилов в контексте исследований микробного разнообразия в целом [2]. Бактерии рода *Bacillus*, в силу их традиционной технологичности, накопленного опыта применения различных штаммов бацилл в биохимических производствах и способности к синтезу разнообразных биологически активных соединений и ферментов, представляют собой наиболее изученную группу алкалофилов. Многие исследованные ранее виды алкалофильных штаммов бацилл в настоящее время составляют особые филогенетические группы внутри рода *Va-*

cillus, некоторые представители близки к группе *B. subtilis* [3]. Среди алкалофильных представителей рода *Bacillus* хорошо изучены продуценты щелочных протеаз, амилаз, липаз и целлюлаз [1]. В существенно меньшей степени исследованы хитиназы и β -маннаназы, охарактеризованные лишь у немногих алкалофильных штаммов бацилл [4]. Биосинтез хитиназ алкалофилами представляет интерес для понимания участия экстремофильных микробных сообществ в естественных процессах биодеградации хитина. В то же время, хитиназы, активные и стабильные в щелочном диапазоне pH, могут широко использоваться в процессах компостирования и конверсии хитин-содержащих отходов переработки морепродуктов, а также в качестве средств биоконтроля насекомых, нематод и клещей – вредителей сельскохозяйственных культур [5]. Продукция β -маннаназ изучена у различных штаммов рода *Bacillus*, однако алкалофильные продуценты этих ферментов известны по единичным работам [6]. Области биотехнологического применения β -маннаназ весьма разнообразны и имеют хороший потенциал дальнейшего развития [7]. Цель настоящей работы состояла в изучении особенностей продукции внеклеточных хитиназ и β -маннаназ штаммом облигатного алкалофильного вида *B. mannanilyticus* IB-OR17, выделенным из донных отложений содового озера Оронгойское (Республика Бурятия, Россия). Данный штамм первоначально был выделен как антагонист фитопатогенных грибов, способных развиваться при щелочных условиях, однако впоследствии у него была обнаружена хитинолитическая активность (рис. 1).



Рис. 1. Гидролиз коллоидного хитина штаммом *B. mannanilyticus* IB-OR17 в щелочной питательной среде (pH~10.0) с 0.5% Na_2CO_3 при росте отдельных колоний (А) и при штриховом посеве (Б) после 72 ч культивирования при 37°C.

Филогенетический анализ гена 16S рРНК (1470 п.о.) показал наибольшее сходство (99.9%) со штаммом вида *B. mannanilyticus* A00–1, за исключением ряда физиолого-биохимических характеристик [8]. Данный штамм также известен как продуцент β -маннаназы [6].

При глубинном культивировании (250 об/мин и 36°C) в жидкой среде, содержащей 0.5% коллоидного хитина и 0.5% соды, штамм показывал индуцибельный синтез хитиназ с уровнем активности около 0.25 ед/мл. Максимальный уровень синтеза хитиназ в интервале pH 9.0–10.0 при концентрациях соды 0.25–0.50%, совпадая с оптимумом роста культуры (рис. 2, А). После окончания экспоненциальной фазы роста *B. mannanilyticus* IB-OR17 на первые сутки культивирования, рост активности обоих ферментов в среде продолжался до 4-х суток, затем β -маннаназная активность достаточно резко снижалась при стабильном уровне хитиназ (рис. 2, Б). Уровень синтеза хитинолитических ферментов возрастал незначительно при концентрациях коллоидного хитина более 0.20–0.25% мас.

В отличие от хитиназ, синтез β -маннаназ штаммом имел конститутивный характер и отмечался в присутствии различных субстратов (табл. 1). В то же время, использование в качестве основного источника углерода специфического субстрата, галактоманнана из камеди бобов рожкового дерева, приводило 10–30-кратному возрастанию секреции β -маннаназы *B. mannanilyticus* IB-OR17 по сравнению с другими субстратами (табл. 1).

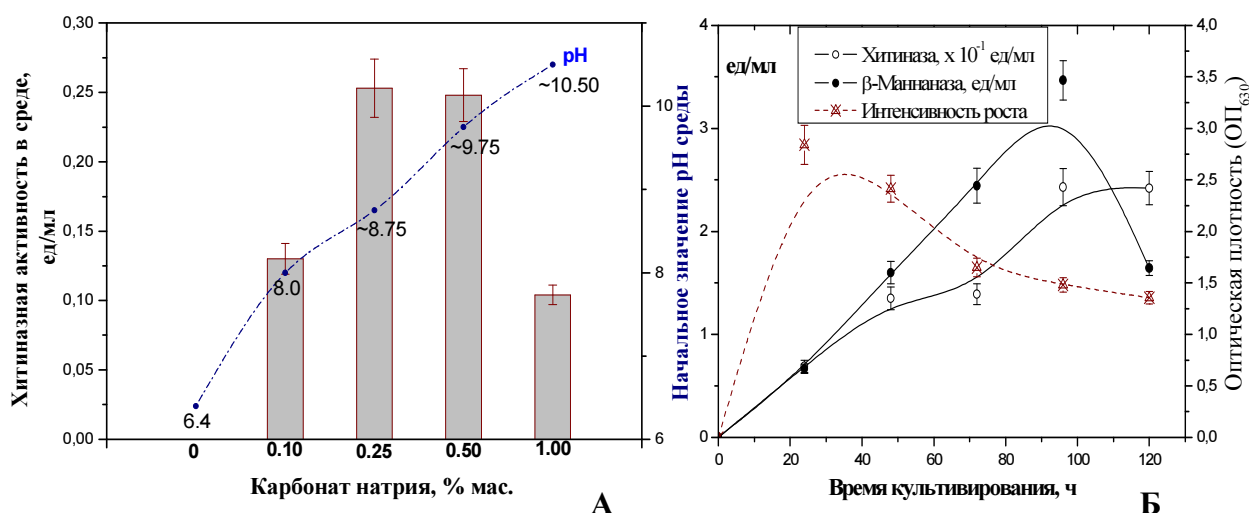


Рис. 2. Влияние начального pH среды/концентрации соды на уровень секреции хитинолитических ферментов штаммом *B. mannanilyticus* IB-OR17 (А). Динамика роста бактерий и накопления хитиназной и β -маннаназной активности в глубинной культуре штамма (Б) при концентрации соды 0.5% и коллоидного хитина 0.5%.

Полученные результаты свидетельствуют о потенциале *B. mannanilyticus* IB-OR17 в качестве перспективного продуцента новых хитиназ и β -маннаназ, стабильно функционирующих в области значений pH 9.0–11.0. Впервые хитиназная активность обнаружена у нового штамма вида *B. mannanilyticus*, являющегося облигатным умеренным алкалофилом.

Таблица 1. Плотность роста и β -маннаназная активность штамма *B. mannanilyticus* IB-OR17 после 96 ч культивирования в средах с различными источниками углерода (36.5±0.5°C, 250 об/мин)

Среда/источник углерода, % мас.	Интенсивность роста ОП ₆₃₀	Накопление β - маннаназы, ед/мл
ЛВ-бульон	1.368±0.034	0.260±0.006
Картофельный отвар	2.788±0.040	1.333±0.020
Мясопептонный бульон	0.768±0.034	0.208±0.005
Декстран 15–20 Т	0.584±0.011	0.789±0.016
Галактоманнан, 0.5%	0.768±0.045	32.917±0.589
Глицерин, 1%	0.512±0.023	0.025±0.002
D-глюкоза, 1%	1.604±0.051	0.042±0.004
Глюкан дрожжей, 1%	2.080±0.011	0.247±0.004
Инулин, 1%	16.392±0.102	0.097±0.004
Карбоксиметилцеллюлоза, Na-соль, 0.5%	0.484±0.017	3.486±0.059
Крахмал картофельный, 1%	6.204±0.200	0.027±0.003
Лактоза, 1%	0.548±0.028	1.145±0.032
D-Маннит, 1%	0.508±0.040	0.014±0.002
Отруби пшеничные, 0.5%	1.864±0.068	3.333±0.078
Солома пшеницы, 1%	2.252±0.096	3.875±0.059
Хитин коллоидный из панцирей краба, 0.5%	0.852±0.108	1.222±0.031
Целлюлоза порошковая Sigmacell, 1%	5.52±0.034	11.112±0.629

Примечание: для всех сред, кроме ЛВ, МПБ и картофельного отвара, в качестве основы использовали модифицированную среду Хорикоши: пептон – 0.4; дрожжевой экстракт – 0.1; KH_2PO_4 – 0.1; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.02; CaCl_2 – 0.01; Na_2CO_3 – 0.5. Источники углерода стерилизовали отдельно.

Литература

1. Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63, No. 4. Pp. 735–750.
2. Preiss L., Hicks D. B., Suzuki S., Meier T., Krulwich T. A. Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications, concepts of early life forms, and bioenergetics of ATP synthesis // *Frontiers in Bioeng. & Biotechnol.* 2015. V. 3. Pp. 1–10. doi: 10.3389/fbioe.2015.00075.
3. Yumoto I., Yamazaki K., Sawabe T., Nakano K., Kawasaki K., Ezura Y., Shinano H. *Bacillus horti*, sp. nov., a new Gram-negative alkaliphilic bacillus // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998. V. 48. Pp. 565–571.
4. Bhushan B. Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkaliphilic *Bacillus* sp. BG-11 // *J. Appl. Microbiol.* 2000. V. 88, No. 5. Pp. 800–808.

5. Sarethy I. P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S. K., Gupta V., Gupta S. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. Review // J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 38, No. 7. Pp. 769–790.
6. Akino T., Nakamura N., Horikoshi K. Production of α -mannosidase and α -mannanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987. V. 26, No. 4. Pp. 323–327.
7. Chauhan P. S., Puri N., Sharma P., Gupta N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological application // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 93, No. 5. Pp. 1817–1830.
8. Nogi Y., Takami H., Horikoshi K. Characterization of alkaliphilic *Bacillus* strains used in industry: proposal of five novel species” // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55, No. 6. Pp. 2309–2315.

Статья рекомендована к печати кафедрой биохимии и технологии
микробиологических производств УГНТУ

The traits of production of extracellular chitinases and β -mannanases by alkaliphilic bacterium *Bacillus mannanilyticus*, strain IB-OR17

E. A. Gayduk¹, N. F. Galymzianova², E. A. Gilvanova²,
G. E. Aktuganov^{2*}

¹Ufa State Petroleum Technological University

1 Kosmonavtov Street, 450062 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

²Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences

69 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

*Email: gleakt@anrb.ru

The ability of novel strain, IB-OR17 related to alkaliphilic species *Bacillus mannanilyticus* to chitin degradation was revealed for the first time. Some aspects of synthesis of chitinases and β -mannanases by the strain were studied under submerged cultivation. The inducible character of chitinase production by *B. mannanilyticus* IB-OR17 was found, while its β -mannanase production is constitutive. Maximal chitinase production was recorded for optimal interval of bacterial growth under pH 9.0–10.0. The impact of various carbon sources on biosynthesis of β -mannanases by *B. mannanilyticus* IB-OR17 was studied.

Keywords: *Bacillus mannanilyticus*, alkaliphilic bacteria, chitinase, β -mannanase.